

ZUM SCHICKSAL DER LIGNOCERINSÄURE
BEIM MARKSCHEIDENZERFALL

Jakob Schmidt

1965.



Digitized by the Internet Archive
in 2026



AUS DER BIOCHEMISCHEN ABTEILUNG (PROFESSOR DR. H. JATZKEWITZ)
DER DEUTSCHEN FORSCHUNGSANSTALT FÜR PSYCHIATRIE
(MAX-PLANCK-INSTITUT), MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. med. G. PETERS

ZUM SCHICKSAL DER LIGNOCERINSÄURE
BEIM MARKSCHEIDENZERFALL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jakob Schmidt
aus Nürnberg

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. H. JATZKEWITZ
Mitberichterstatter:	Professor Dr. Th. BÜCHER
Dekan:	Professor Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 9.11.1965

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	5
Gang der Untersuchung	7
1. Darstellung der radioaktiven Lignocerinsäure	8
2. Experimenteller Markzerfall	13
3. Aufarbeitung	14
Material und Methodik	17
1. Darstellung von ^3H -markierter Lignocerinsäure	17
a. Gewinnung einer Kerasinfraktion	17
b. Isolierung der Kerasinfettsäuren	17
c. Tritierung	18
d. Reinigung der rohen aktiven Lignocerinsäure	18
e. Darstellung der Natriumlignoceratsuspension	19
2. Operation und Applikation	19
3. Aufarbeitung	20
a. Säulenchromatographische Auftrennung des Ätherextrakts	20
b. Untersuchung der Fettsäuren	21
c. Untersuchung der Esterfraktion	21
4. Radiochemische Meßmethoden	22
a. Messung mit dem Radiopapierchromatographen	22
b. Messung im Flüssigkeits-Szintillationszähler	22
Ergebnisse	22
Diskussion	27
Zusammenfassung	34
Literaturverzeichnis	35

EINLEITUNG

Die Markscheide erfährt bei ihrem Zerfall tiefgreifende Umwandlungen in ihrer chemischen Zusammensetzung. Nach dem Rossiterschen Schema (1) (Abb. 1), dem Studien über die Wallersche Degeneration am peripheren Nerven der Katze zugrunde liegen, werden Sphingolipide und Glycerin-phosphatide, die zusammen mit Cholesterin den Lipoidanteil der Markscheide, das Myelin, bilden, hydrolytisch gespalten und die freiwerdenden Fettsäuren mit Glycerin und Cholesterin verestert, während die hydrophilen Spaltprodukte aus dem Demyelinisationsbereich verschwinden.

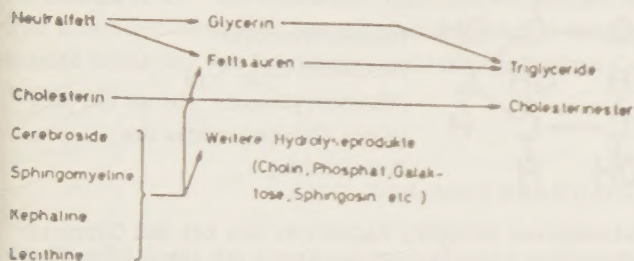
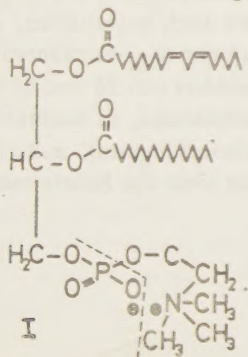


Abb 1

Schema nach Rossiter
Chemische Veränderungen
der Markscheidenlipide
(Waller'sche Degeneration
am peripheren Nerven der
Katze)
Zur Nomenklatur vgl. S. 3

Untersuchungen, die von Jatzkewitz und Mehl (2) über das Schicksal der C_{24} -Fettsäuren beim sudanophilen Myelinabbau angestellt worden sind, haben gezeigt, daß dieses Schema nicht ausreicht, alle beim Markzerfall sich abspielenden chemischen Veränderungen zu erklären. Weder in der Fraktion der freien Fettsäuren noch als Bestandteil der neugebildeten Ester konnten die C_{24} -Fettsäuren, die bekanntlich unter den Fettsäuren der Sphingolipide dominieren (3, 4, 5), auch nur annähernd in dem Ausmaß gefunden werden, als nach der Menge der zerfallenen Stammsubstanzen zu erwarten gewesen wäre.

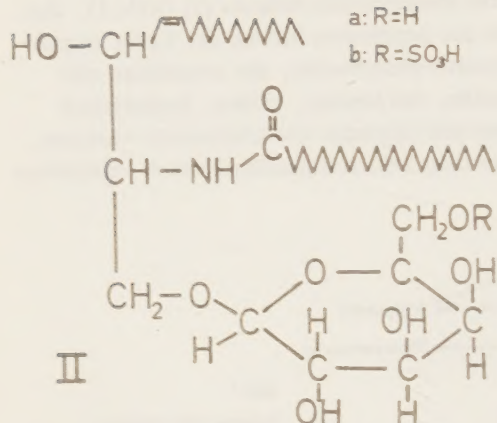


Wie bereits erwähnt, besteht das Myelin - zu etwa gleichen Teilen - aus drei Komponenten: aus Cholesterin, den Glycerinphosphatiden (I) und den Sphingolipiden (II).

Glycerinphosphatide
z. B. Lecithin (I)

(An die Stelle des Cholinrestes tritt beim Colaminkephalin Colamin, beim Serinkephalin Serin ein.)

Sphingolipide z.B. Cerebroside (IIa)



Zucker: Galaktose
Fettsäure: C₂₄, C₂₄-OH
Cerebrosidschwefelsäureester (IIb)

Galaktose-C₃-Sulfat
Fettsäure: C₂₄, C₂₄-OH

Sphingomyelin

Phosphorylcholin
Fettsäure: C₂₄, C₁₈
(Phosphorylcholin tritt an die Stelle des Galaktoserestes der Cerebroside)

Während Cholesterin eine Reinsubstanz darstellt, handelt es sich bei den Glycerinphosphatiden und Sphingolipiden um Stoffklassen, die eine Vielzahl von Verbindungen umfassen. Diese Vielfalt ist vor allem dadurch bedingt, daß die Fettsäuren, die bei den Glycerinphosphatiden meist esterartig, z. T. aber auch ätherartig (Plasmalogenphosphatide), bei den Sphingolipiden säureamidartig (an die Aminogruppe des Fettaminoalkohols Sphingosin) gebunden sind, Unterschiede aufweisen. Bei den esterartig gebundenen Fettsäuren überwiegen die C₁₈-(Stearin-, Ölsäure) und C₁₆-Fettsäuren (Palmitinsäure); daneben finden sich geringe Mengen höherer, ungesättigter Fettsäuren. Der größte Teil der Sphingolipidfettsäuren ist dagegen durch eine Kettenlänge von 24 C-Atomen charakterisiert; es handelt sich um Lignocerinsäure(n-Tetracosansäure), Nervonsäure (Δ^{15} -n-Tetracosensäure), Cerebronsäure (α -Hydroxy-n-tetracosansäure) und Oxynerbonsäure (α -Hydroxy- Δ^{15} -n-tetracosensäure). Demgemäß hat man bei den Cerebrosiden Kerasin (Lignocerinsäure), Nervon (Nervonsäure), Cerebron (Cerebronsäure) und Oxynervon (Oxynerbonsäure) unterschieden und diese Bezeichnungen auch beibehalten, als man mit Hilfe verfeinerter Analysenmethoden fand, daß den C₂₄-Fettsäuren in den Cerebrosiden niedrigere und höhere Homologe (besonders mit 25 und 26 C-Atomen) beigemischt sind. Spricht man von den Reinsubstanzen, so benützt man den Ausdruck N-Acyl-psychosin (Psychosin = Galaktosido-sphingosin), z. B. N-Lignocerylpsychosin. Anstelle von N-Acyl-sphingosin ist auch die Bezeichnung Ceramid üblich.

Cerebronsäure und Cerebronylsphingosin, das durch partielle Hydrolyse aus Cerebron hätte entstehen können, waren überhaupt nicht nachzuweisen, Lignocerinsäure und das entsprechende Ceramid nur in kleiner Menge vorhanden. Dagegen lagen sehr viele C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren (Palmitin-, Stearin-, Ölsäure) in freier und veresterter Form vor. Diese Beobachtung führte die Untersucher zu der Annahme, daß während der Entmarkung Fettsäuren abgebaut werden, und daß von diesem Abbau vornehmlich die langkettigen Fettsäuren der Sphingolipide betroffen sind.

In der vorliegenden Studie wurde das Schicksal der C_{24} -Fettsäuren beim Markzerfall mit Hilfe der Isotopenmarkierungstechnik (tritiummarkierter Lignocerinsäure) verfolgt und gefunden, daß ein Abbau stattfindet, der zur Bildung kürzerkettiger Fettsäuren führt. Die erhaltenen Ergebnisse werden am Schluß der Studie erörtert und eine Hypothese über den Abbaumechanismus dargelegt, die die eigenen Resultate sowie das von Jatzkewitz und Mehl gefundene C_{24} -Fettsäuredefizit erklärt.

GANG DER UNTERSUCHUNG

Die Durchführung der Untersuchung war mit methodischen Schwierigkeiten verbunden, die zunächst vor allem die Synthese und Reinigung der radioaktiven Lignocerinsäure betrafen. Ferner mußte eine Operationstechnik ausgearbeitet werden, die es gestattete, die experimentelle Auslösung eines Markzerfalls mit der Applikation der Lignocerinsäure in den Zerfallsherd zu kombinieren. Für das präparative und analytische Arbeiten erwies es sich als notwendig, bekannte dünn-schichtchromatographische Verfahren zu modifizieren.

1. DARSTELLUNG DER RADIOAKTIVEN LIGNOCERINSÄURE

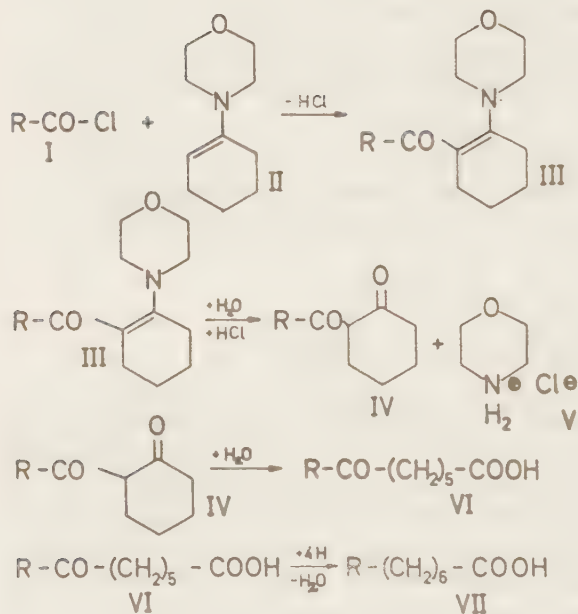


Abb. 2 Kettenverlängerung von Fettsäuren um 6-C-Atome nach Hünig, Lücke und Benzing

Um den postulierten Abbau der C_{24} -Fettsäuren unmittelbar verfolgen zu können, mußte die Verteilung der radioaktiven Atome im Molekül so gewählt werden, daß auch nach wiederholter oxydativer Verkürzung das Restmolekül aktiv blieb. Die häufig zur Untersuchung des Fettsäurestoffwechsels herangezogenen und verhältnismäßig einfach zu gewinnenden 1- ^{14}C -Monocarbonsäuren waren daher ungeeignet. Es wurde deshalb versucht, aus käuflicher Stearinsäure "uniformly labelled" (= gleichmäßig in allen Positionen ^{14}C -markierte Stearinsäure) durch Kettenverlängerung die gewünschte Lignocerinsäure darzustellen.

Hierbei wurden die Synthesevorschriften von Hünig, Lücke und Benzing (6) benützt:

Man läßt die Chloride der Fettsäuren (I) auf Morpholinocyclohexen (II) einwirken, spaltet von den entstandenen Acyl-morpholinocyclohexenen (III) den Morpholinring (V) ab und führt die gebildeten Diketone (IV) durch Aufspaltung des Cyclohexanonrings in die 7-Ketosäuren (VI) über, die schließlich mit Hydrazinhydrat zu den nichtumsetzbaren, um sechs C-Atome verlängerten Fettsäuren (VII) reduziert werden.

Wegen der Kostspieligkeit des Ausgangsmaterials und zur Erreichung einer möglichst hohen spezifischen Aktivität, die beliebiges Verdünnen mit inaktivem Träger nicht gestattete, wurde im Mikromaßstab gearbeitet. Dabei erwies sich der oben skizzierte Syntheseweg, der sich in Vorversuchen mit Gramm-Mengen gut reproduzieren ließ, als praktisch ungangbar: 20 mg Stearinsäure (nach Verdünnung) mit 0,1 mC Gesamtaktivität ergaben eine Ausbeute von 1% Lignocerinsäure.

Wesentlich einfacher ist die gewünschte Markierung mit Tritium (^3H) zu erreichen, doch wurde das Arbeiten mit diesem Isotop wegen seiner geringen Strahlungsenergie erst möglich, nachdem ein Flüssigkeits-Scintillationszähler in Betrieb genommen worden war. Ungesättigte Fettsäuren liefern bei der Reduktion mit Tritium unter Zurückdrängung der Substitutionsreaktion ausschließlich Additionsprodukte (7), d.h. das ^3H -Atom last sich stabil an genau definierter Stelle ins Molekül einführen. Man ist also in der Lage, aus einer geeigneten ungesättigten Verbindung in einer einzigen chemischen Reaktion durch Tritierung (hier immer analog zu Hydrierung gebraucht) die gewünschte radioaktive Substanz zu erhalten. Dazu wurde eine im ω -Teil ungesättigte, nichtsubstituierte C_{24} -Fettsäure benötigt. Als geeignetes Ausgangsmaterial bot sich Nervonsäure an, deren Doppelbindung nach den Untersuchungen von Kishimoto und Radin (8) (an den Sphingolipoidfettsäuren aus Schweinehirn) hauptsächlich in Δ^{15} -, zum Teil in Δ^{17} - und in Spuren auch in Δ^{14} -Stellung liegt. Nervonsäure läßt sich zusammen mit niedrigeren und höheren Homologen verhältnismäßig einfach aus biologischem Material gewinnen.

Als Ausgangsmaterial dienten Rohcerebroside von menschlichem Gehirn und Rindermark. Durch Merkanalyse der aus den Rohcerebroside säulenchromatographisch isolierten Kerasinfraction *) und Verseifung der Fettsäuremethylester wurde ein Gemisch von gesättigten und ungesättigten nichtsubstituierten Fettsäuren gewonnen. Um daraus die radioaktiv markierte Lignocerinsäure zu erhalten, wurde zuerst die Tritierung durchgeführt. Dabei ergab sich durch die Umwandlung der ungesättigten in gesättigte Fettsäuren eine erste Reinigung des heterogenen Gemisches durch Verringerung der Komponentenzahl.

An diesen ersten Schritt sollte sich die säulenchromatographische Abtrennung der höheren und niedrigeren Homologen der Lignocerinsäure schließen. Da Experimente mit undecanimpregn timer Säulen fehlschlügen und auch die Methode von Nijkamp (9), bei der die Fettsäuren mit Isooctan an ammoniakbromthymolblau-impregn iertem Kieselgel getrennt werden, versagte, wurde die Möglichkeit der

*) Da sich die Cerebroside säulen- und dünn schichtchromatographisch nur in zwei Typen auftrennen lassen, die durch das Vorliegen oder Fehlen hydroxyl-substituierter Fettsäuren charakterisiert sind, werden die Bezeichnungen Kerasinfraction (Kerasin + Nervon) und Cerebronfraction (Cerebron + Oxy nervon) benutzt (15).

dünnschichtchromatographischen Reinigung geprüft. Zwar ergaben Vorversuche mit inaktiven Fettsäuren, daß bei der Dünnschichtchromatographie der Fettsäuren nach Kaufmann und Makos (10) Beladungskapazität, Trennschärfe im C_{24} -Fettsäurebereich und Nachweisempfindlichkeit (mit Bromthymolblau (10)) ziemlich gering sind; in Kombination mit radiochemischen Meßmethoden erwies sich jedoch das Verfahren als sehr nützlich. Die hohe spezifische Aktivität des mit Iridiummarkierten Fettsäuregemisches ermöglichte die Auswertung des Dünnschichtchromatogramms mit dem Methandurchflußzähler. Dazu wurde die mit einem Dünnschichtfixativ imprägnierte Kieselgelschicht von der Platte abgelöst. Die durch diese Imprägnierung flexibel (papierartig) gemachte Schicht konnte im Radioptierchromatographen kontinuierlich auf Aktivität überprüft werden. Die Methode erlaubte die Unterscheidung eines C_{26} -, C_{25} -, C_{24} -, C_{23} - etc. -peaks in dem Fettsäuregemisch, dessen Aktivitätsspektrum genau den Angaben Radins (3) über die Zusammensetzung der normalen, ungesättigten Cerebrosidfettsäuren beim Menschen entspricht. (Abb. 3)

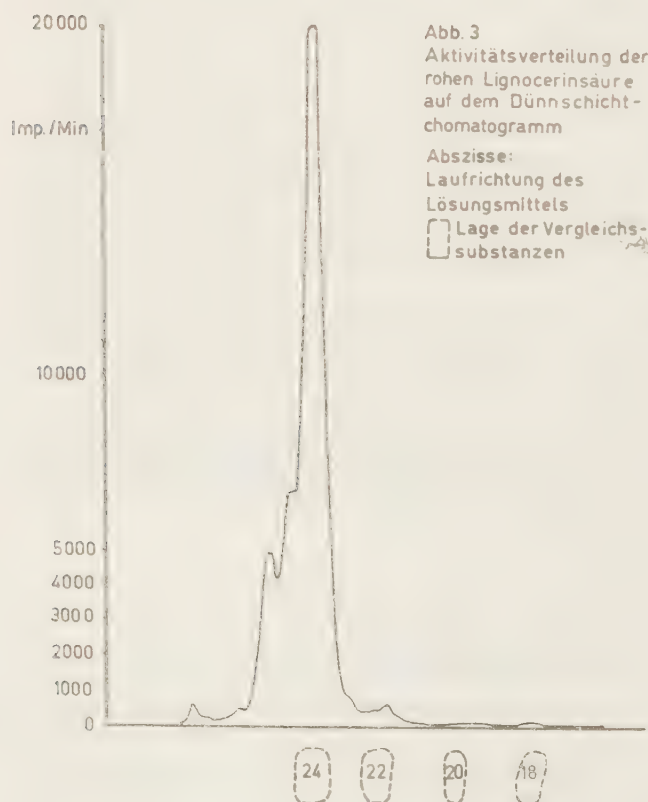
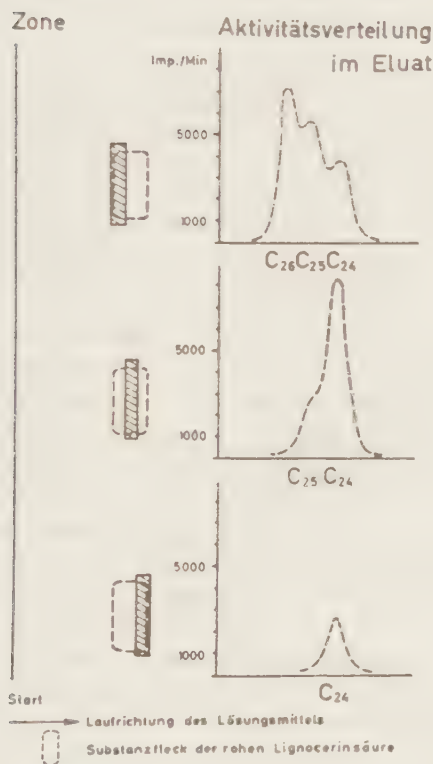


Abb. 4

Dünnschichtchromatographische
Reinigung der Lignocerinsäure



Um nun zu prüfen, ob die präparative Reinigung der rohen Lignocerinsäure dünn-schichtchromatographisch möglich ist, wurde in einem Vorversuch der Substanzfleck des Fettsäuregemisches in drei Zonen aufgeteilt, die gesondert abgekratzt und eluiert wurden. Eine zweite Chromatographie, die mit dem Eluat durchgeführt wurde, ergab, daß sich die Lignocerinsäure auf diese Weise in guter Ausbeute sehr rein gewinnen läßt. (Abb. 4)

Da, wie bereits angedeutet, bei der dünn-schichtchromatographischen Trennung von höheren Fettsäuren Überladungen beobachtet werden, wenn mehr als 5 bis 10 μg Einzelkomponente pro cm

Startlinie aufgetragen werden, mußte die Reinigung der Lignocerinsäure auf einer größeren Anzahl von Platten durchgeführt werden. Es wurden daher Versuche unternommen, die Methodik zu vereinfachen:

Bei der Dünnschichtchromatographie der Fettsäuren nach Kaufmann handelt es sich um ein sog. Umkehrphasenverfahren, das nach dem Vorbild ähnlicher Techniken in der Papierchromatographie entwickelt wurde. Hierbei stellt das Trägermaterial (Papier, Kieselgelschicht) nicht wie sonst die hydrophile Phase dar, sondern wird durch Behandlung mit unpolaren Substanzen (Kohlenwasserstoffen, Siliconöl) hydrophobiert. Kaufmann und Makus (10) erreichten dies dadurch, daß sie Platten in üblicher Weise beschichteten und nach dem Trocknen durch Eintauchen in ein Undecan-Petroläthergemisch (hydrophobe Phase) imprägnierten. Abweichend

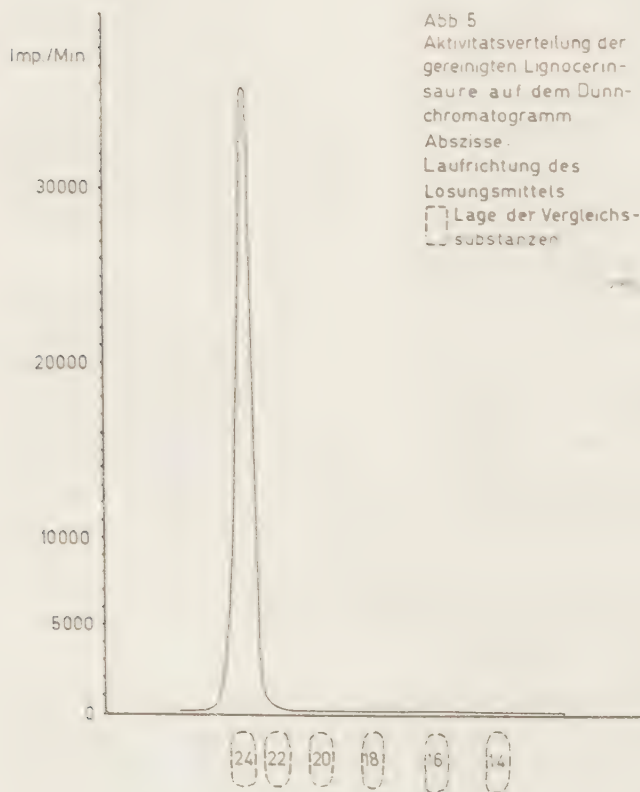
von diesem Vorzahn (Abb. 4) das beschichtete und imprägnierte der Platten in einen Arbeitsgang ausanmonolom, indem man die Strahlmasse unmittelbar aus Kieselgel und hydrophober Phase bereitet. Das Verfahren hat folgende Vorteile: Das unmittelbare Imprägnieren bewirkt beschichteter Platten einfallt; da kein Abbindeprozess stattfindet, kann das Streichgut in geeigneten Gefäßen längere Zeit aufbewahrt werden; die gegebenen Platten können sofort verwendet werden.

Zur Sichtbarmachung der Fettsäure wurden Lösungsmittel und Imprägnierung aus der Schicht entfernt und danach Wasser als Eluentmittel kontinuierlich gelassen. Die Fettsäuren, deren R_F -Werte sich durch diese Behandlung nicht veränderten, lie-

ben sich auf der Platte deutlich als Bereiche geringerer Transparenz ab. Mit dieser Technik lassen sich die Schwierigkeiten umgehen, die das Besprühen empfindlicher bindemittelfreier Sorptionschichten mit sich bringt; die Trennung der gewonnenen Substanz vom Färbereagenz erübrigt sich; von der noch feuchten Platte lassen sich die gewünschten Zonen mit dem Spatel rasch und quantitativ entfernen; eine Kontamination mit radioaktivem Kieselgelstaub wird vermieden.

Das durch Elution

aus dem abgeschabten Kieselgel erhaltene Material wurde nach nochmaliger chromatographischer Auftrennung im Methandurchflußzähler geprüft und erwies sich als reine Lignocerinsäure. (Abb. 5). Nach Zerschneiden des Dünnschichtchromato-



grammstreifens in Segmente wurde noch eine Messung im Szintillationszähler angeschlossen, um jede Verunreinigung der Lignocerinsäure mit niedrigeren Homologen auszuschließen.

2. EXPERIMENTELLER MARKZERFALL

Teilprozesse der Demyelinisierung, etwa die Hydrolyse der Phosphatide, lassen sich *in vitro* durch Zusatz von Kobragift, Bakterientoxinen und bestimmten Enzymen nachahmen (1). Den ganzen komplizierten Chemismus der Entmarkung kann man so nicht reproduzieren, da es sich hierbei um Leistungen spezieller Abraumzellen (wegen ihres Gehalts an fettartigen Abbauprodukten auch als Fettkörnchenzellen bezeichnet) handelt. Der Markzerfall mußte also *in vivo* studiert werden.

Man kann im Tierversuch Entmarkungen durch grobmechanische und thermische Insulte hervorrufen, ferner durch Gifte, Infektionen, Allergene und Gefäßunterbindung. Die letztgenannte Methode bot sich zunächst als geeignet an, da die damit erzielten Ergebnisse einen unmittelbaren Vergleich mit den Befunden an Erweichungen gestattet hätten. Die Technik der Gefäßunterbindung (an Ratten) hat jedoch den Nachteil, daß meist nur Parenchymnekrosen erzielt werden. Lage und Umfang der gelegentlich auftretenden Markzerfallsherde variieren und bleiben am lebenden Versuchstier unbekannt, so daß die gezielte Applikation des Tracers praktisch unmöglich ist. Dazu kommt der erhebliche experimentelle Aufwand, da die einfache Carotisunterbindung nicht genügt, sondern zusätzlich eine Sauerstoffinhalationsbeatmung durchgeführt werden muß (11). Auf die Anwendung von Giften und Allergenen sowie auf experimentelle Infektionen wurde verzichtet, einmal wegen der damit verbundenen technischen Schwierigkeiten, zum andern, um den Einfluß inkontrollierbarer Faktoren möglichst auszuschließen. Schließlich erwies sich die einfache Hitzekoagulation, durch die man Markzerfallsherde mit beträchtlicher zellulärer Reaktion (Fettkörnchenzellen) erzielen kann (12), als brauchbares Verfahren. (Abb. 6-9) Als Versuchstiere erschienen Ratten besonders geeignet, da sie unempfindlich und neurochemisch gut untersucht sind. Aus Gründen der Standardisierung wurden Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Sie waren bei dem durchgeführten Eingriff allerdings etwas weniger widerstandsfähig als die zuvor benutzten Fausstammtiere. Die Überlebenszeiten wurden in Anlehnung an die in der Humanpathologie bei der Erweichung übliche Stadieneinteilung gewählt: zwei bis drei Tage nach dem Gefäßverschluß wird das nekrotische Stadium abgelöst von einer Abbauphase, die nach Wochen und Monaten ins Narbenstadium übergeht (13).

3. AUFARBEITUNG

Da Abbauprodukte der radioaktiven Lignocerinsäure in den freien Fettsäuren, Triglyceriden oder Cholesterinestern zu erwarten waren (Rossitersches Schema (1)), beschränkte sich die Untersuchung auf diese ätherlöslichen Lipide. Der aus den vereinigten Markzerfallsstadien gewonnene Ätherextrakt wurde aufgetrennt in Phosphatide, Fettsäuren und eine Esterfraktion, die Cholesterin, Cholesterinester und die Glyceride enthielt. Um bei der Analyse der freien sowie der durch Hydrolyse aus den Triglyceriden erhaltenen Fettsäuren Radioaktivität in den kürzerkettigen Homologen als abbaubedingt deuten zu können, mußte in einem Vorversuch die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß bei der dünn-schichtchromatographischen Trennung der Fettsäuren nach Kaufmann Säuren verschiedener Kettenlängen durch Mitschleppeffekte miteinander verunreinigt sind.

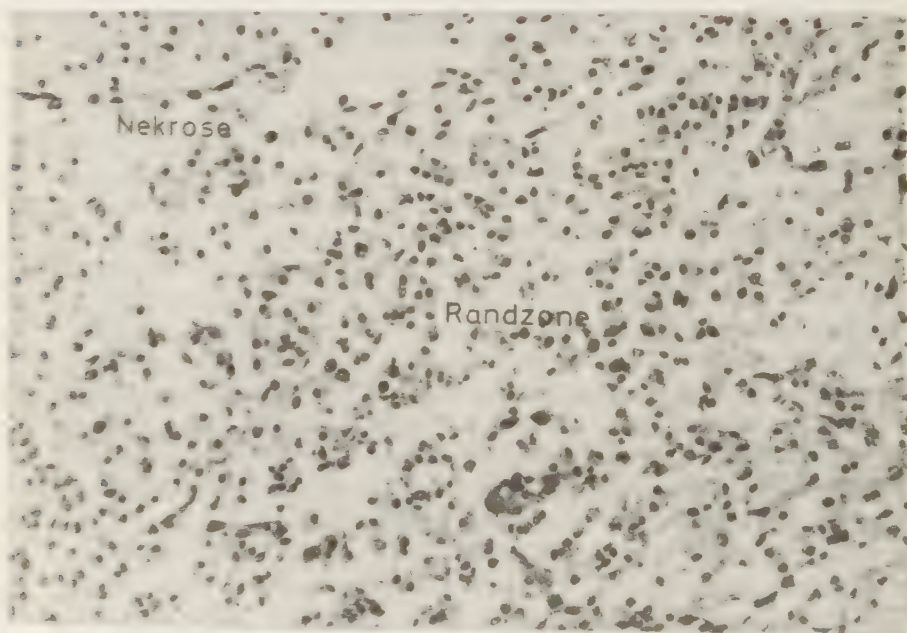


Abb. 2 Nekroterandzone (HE, 4. Tag nach Versuchsbeginn)



Abb. 7. Randzone mit Makrophagen (HE, 8. Tag nach Versuchsbeginn)

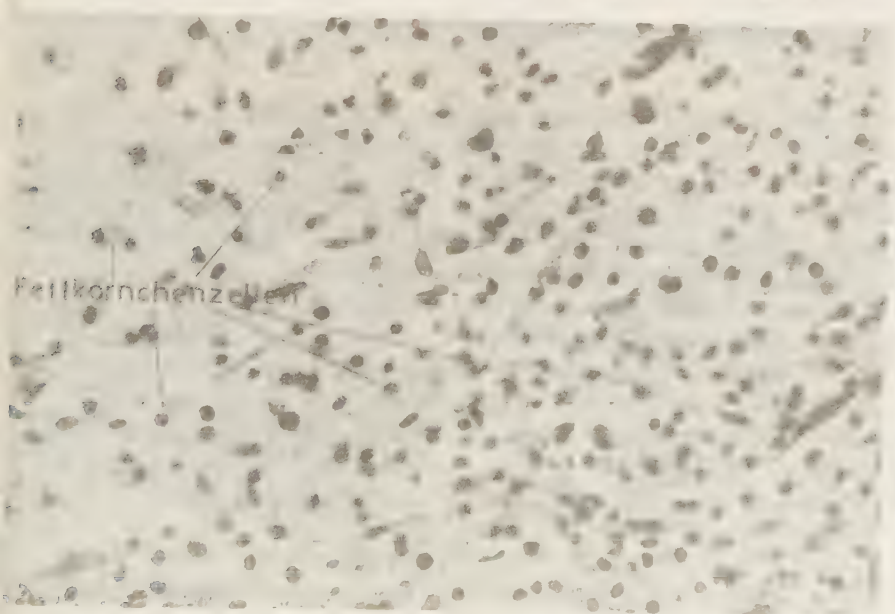


Abb. 8. Ausschnitt aus einem Markumfallbereich mit Fettkörnchenzellen (8. Tag nach Versuchsbeginn)

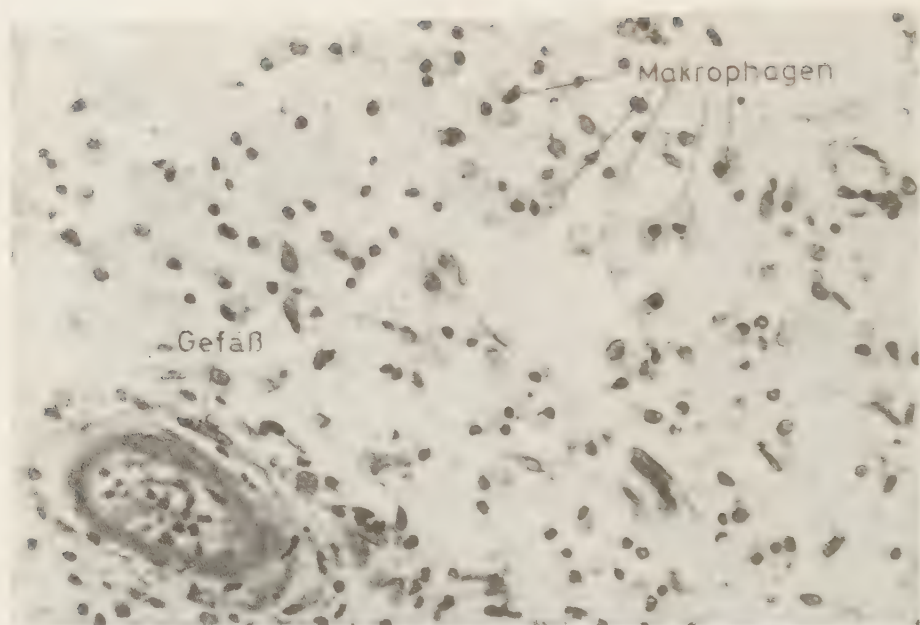


Abb. 9 Mit fettigen Abbauprodukten beladene Makrophagen (Fettkörnchenzellen)
(Van Gieson, 16. Tag nach Versuchsbeginn)

Die Untersuchung der Esterfraktion (Triglyceride und Cholesterinester) gestaltete sich besonders schwierig, da wegen der geringen Substanzmengen die säulenchromatographische Auftrennung der Ester und ihre anschließende Verseifung nicht möglich war. Hätte man versucht, diese Schwierigkeit durch Verdünnung der erhaltenen Substanzen mit inaktivem Trägermaterial zu umgehen, dann wäre die dünn-schichtchromatographische Analyse der Fettsäuren durch Überladungseffekte sehr erschwert worden. Die drei Arbeitsgänge Estertrennung, Esterverseifung und Fettsäurechromatographie wurden deshalb auf einer einzigen Dünnschichtplatte durchgeführt. Zur Hydrolyse wurde Salzsäure verwendet. Eine alkalische Verseifung, wie sie Kaufmann mit Erfolg an Triglyceriden aus Pflanzenölen auf dem Papierchromatogramm durchführte (14), kommt bei der Verwendung von Kieselgelplatten nicht in Betracht (Wasserglasbildung). Die Cholesterinester, die auf der Platte nur in geringem Ausmaß gespalten werden konnten, mußten gesondert untersucht werden.

MATERIAL UND METHODIK

1. DARSTELLUNG VON ^3H -MARKIERTER LIGNOCERINSÄURE

a. Gewinnung einer Kerasinfraktion^{†)} nach Mehl und Jatzkewitz (15)

200 g Florisil (200 mesh) werden zunächst mit 95proz., dann mit absolutem Methanol geschlämmt, 15 Stdn. bei 50° aktiviert und 22 Stdn. mit 20 ml Wasser in der Schlüßflasche gesättelt. 155 g so entaktiviertes Florisil werden in Chloroform-Methanol-Wasser 80:0:0,25 aufgeschwemmt und in eine Säule von 3 cm Durchmesser 45 cm hoch eingefüllt. 2,0 g Rohcerebroside aus Menschen- und Rindhirn werden in 75 ml angewärmtem Elutionsmittel (Chloroform-Methanol-Wasser 70:30:2,5) gelöst und in kleinen Portionen auf die Säule gegeben. Das Eluat wird in Fraktionen von je 100 ml geschritten, die laufend dünnschichtchromatographisch auf den Gehalt an Cholesterin geprüft werden (Elutionsmittel: Chloroform-Methanol 70:30 (10)). Fraktion III enthält Cholesterin, in den Fraktionen VI bis VIII finden sich Fettsäuren bzw. Triglyceride, ab Fraktion XII erscheint die Kerasinfraktion^{†)}. Die Fraktionen XIX bis XXVI enthalten dann neben abnehmenden Mengen Kerasinzunehmende Mengen Cerebronfraktion^{†)}. Hierauf folgt Cerebronfraktion^{†)} allein, die in Fraktion XXVIII quantitativ eluiert ist, nachdem von Fraktion XIX an der Methanolanteil im Elutionsmittel auf 10% erhöht worden ist. Der Ausbeute an (dünnschichtchromatographisch) reiner Kerasinfraktion^{†)} beträgt 317 mg, an Cerebronfraktion^{†)} 623 mg.

b. Isolierung der Kerasinfettsäuren

430 mg Kerasinfraktion^{†)} werden mit 25 ml einer 10proz. methanolischen Schwefelsäure 6 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Die Fettsäuremethyl Ester werden nach dem Abkühlen mit Petroläther ausgeextrahiert. Die Ätherphase mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet und unter Vakuum abgedampft. Diese gewaschenen 13,5 mg Methyl Ester werden mit 10 ml einer 20 ml einer Lösung von 2,5 g Phosphorsäure in 100 ml Äthanol versetzt und 2 1/2 Stdn. bei 70° im Trockenschrank stehen gelassen. Nach Ansäuern, Ausschleichen und Abdampfen verbleibt 177 mg Fettsäure, einfach kristallin. Die dünnschichtchromatographische Trennung (10) ergibt einen Gemisch mit dem R_F -Wert des Myristinsäure und einem Gemisch mit dem R_F -Wert der Palmitinsäure. Nach Abtrennen des Myristinsäuregemisches bleibt eine 100%ige C₁₆-Fettsäure zurück, während um ihres Fortbleibens willen^{†)}. Die einfache 100%ige C₁₆-Fettsäure Nervensäure, geht aus einer totalalkalisch-methanolischen Phase hervor, die chromatologisch mit analogen reiner Nervensäure vergleichbar ist. Die chromatographische Auswertung liefert, das Chloroform: Methanol: Wasser Verhältnis 80:30:2,5 + 10:90:0,25, stimmt mit den in der Literatur (15) angegebenen Werten überein.

^{†)} Vgl. Fußnote S. 9.

c. Tritierung

Für die der Hydrierung entsprechende Tritierung der ungesättigten Fettsäuren wird eine Apparatur verwendet, die im wesentlichen der von Wacker und Träger (17) angegebenen entspricht, an die Stelle des Tritiumspeichers tritt unmittelbar die Tritiumampulle.

Im Reaktionsgefäß werden zunächst 38 mg des Fettsäuregemisches in 16 ml warmem Eisessig gelöst und nach Zusatz von drei mg PtO_2 in einer Eis-Kochsalzmischung eingefroren. Darauf wird die Anlage dreimal nacheinander mit Stickstoff und dreimal mit Wasserstoff gespült und schließlich auf 10^{-2} Torr evakuiert.

Etwa die Hälfte des Inhalts einer 5C -Tritiumampulle (The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England) wird mittels Quecksilberbirne in das Reaktionsgefäß umgepumpt, und dann das nahezu trägerfreie Tritium (97% T_2/H_2) mit Wasserstoff auf Atmosphärendruck verdünnt (Verdünnungsverhältnis etwa 1 : 7). Das Reaktionsgemisch wird 24 Std. bei Zimmertemperatur geschüttelt. Zur Entfernung des austauschbaren Tritiums in der Carboxylgruppe löst man das rohe Tritierungsprodukt mehrmals in Chloroform-Methanol und dampft das Lösungsmittel ab. Die spezifische Aktivität erreicht schließlich den konstanten Wert von $2 \cdot 10^6$ imp. Mit. je μg . Die radioaktive Lignocerinsäure wird in Petroläther gelöst aufbewahrt.

d. Reinigung der rohen aktiven Lignocerinsäure

10 g Kieselgel 60 nach Stahl (Merck) werden mit 130 ml Petroläther p. A. Siedebereich $60 - 80^\circ$ (Merck) - Undecan stand. (Haltermann) ($80 - 100$ Vol. Teile) im hohen Becherglas zu einem luftblasenfreien Brei verrührt und in das normale Streichgerät der DESAGA-Ausstattung gefüllt. Mit dieser Menge lassen sich 10 Platten beschichten. Auf insgesamt 40 "direktumprägnierten" Platten werden auf der Startlinie je ca. $150 \mu\text{l}$ der Stammlösung ($1 \mu\text{g}$ rohe Lignocerinsäure je μl) als Strich von etwa 16 cm Länge und in gleicher Höhe links und rechts davon ein Gemisch von Testsubstanzen (Laurin-, Myristin-, Palmitin-, Stearin-, Arachin-, Behen- und Lignocerinsäure) aufgetragen. Als (aufsteigendes) Fließmittel dient ein Gemisch aus gleichen Teilen Eisessig-Acetonitril-Methanol, das zu 80% mit der stationären Phase gesättigt ist. Der Methanolzusatz zu dem von Kaufmann und Maxam (10) angegebenen Lösungsmittelsystem steigert die Trennschärfe im C_{22} -Fettsäurenbereich. Zur Chromatographie werden die üblichen Trennkammern 20×25 cm benutzt, durch Einlegen passend gebogener V2A-Stahl-Blechstreifen

Alle quantitativen Aktivitätsangaben beziehen sich hier und auf den folgenden Seiten auf die Messung im Flüssigkeits-Szintillationszähler.

wird das Fassungsvermögen dieser Kammern auf je 6 Platten erhöht. Die Laufzeit beträgt 3 Stunden. Durch einstündiges Aufbewahren im Trockenschrank bei 120° werden Fließmittel und Imprägnierung entfernt. Nachdem die Platten abgekühlt sind, werden sie in eine Kammer gestellt, die Wasser als Fließmittel enthält; das Wasser steigt hoch und die Schicht bindet ab. Auf der noch feuchten Dünnschichtplatte heben sich die Substanzflecken der Testfettsäuren und das Band der Lignocerinsäure deutlich als Bereiche geringerer Transparenz ab. Die abgebundene Sorbenschicht kann ohne Gefahr der mechanischen Beschädigung zusätzlich mit Färbereagenzien besprüht werden. Von dem Lignocerinsäurestreifen wird nur der obere (frontnähere) Teil mit dem Spatel von der noch feuchten Platte abgekratzt. Das so gewonnene Material wird getrocknet und wiederholt mit Chloroform-Methanol eluiert. Die spezifische Aktivität der gereinigten Säure beträgt $1,2 \cdot 10^6$ Imp./Min je μg .

e. Darstellung der Natriumlignoceratsuspension

Die Injektionslösung wird in Anlehnung an Gatt (18) hergestellt: Eine äquimolare Menge kochender Natronlauge wird mit der athanolischen Lösung der radioaktiven Lignocerinsäure tropfenweise versetzt und der Alkohol unter wiederholtem Zusatz von Wasser quantitativ abdestilliert. Die fertige Lignoceratsuspension enthält $1,5 \cdot 10^6$ Imp./Min je μl . Die dünnschichtchromatographische Prüfung mit Äthylendichlorid (16) ergibt einen Gehalt an Fettsäureestern in Höhe von 1,5% der Gesamtaktivität. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Lignocerinsäuremethylester, der sich bei der vorübergehenden Aufbewahrung der Substanz in Chloroform-Methanol gebildet hat.

2. OPERATION UND APPLIKATION

Als Versuchstiere dienen 60 männliche, etwa 10 Wochen alte Sprague-Dawley-Ratten. Die Tiere erhalten eine Äthernarkose. Die Kopfhaut wird rasiert und median in einer Länge von ca. 2 cm gespalten, dann der Schädelknochen rechts paramedian knapp hinter der sutura coronaria vom Periost befreit und mittels Dentalbohrer trepaniert (Abb. 10). Durch das 2 mm weite Bohrloch wird die konisch zugefeilte Spitze eines aufgezogenen Lorkoibens 4–5 mm tief eingeführt und etwa 10 sec. dort belassen. Anschließend werden in der Nekrosezone mit einer 50 μl -Hamiltonspritze 10 μl der Natriumlignoceratsuspension injiziert. Ein Teil davon fließt regelmäßig zurück oder wird durch Blutungen weggespült. Der Hautschnitt wird geklammert. 52 Tiere überleben den Eingriff und erholen sich zunächst ziemlich gut. Die postoperative Sterblichkeit im Verlauf der ersten Woche ist sehr hoch (30%).

Durchschnittliche Ausdehnung
des Nekroseherdes

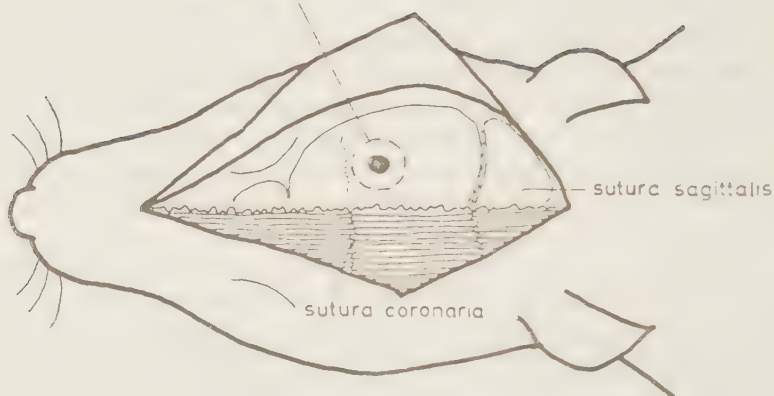


Abb.10 Lage des Trepanationsloches

3. AUFARBEITUNG

Die Tiere werden gruppenweise nach verschiedenen Überlebenszeiten mit Chloroform getötet. Das Gehirn wird freigelegt und das gewöhnlich gut demarkierte nekrotische Material entnommen. Die vereinigten Nekroseherde, deren Frischengewicht je etwa 100 mg beträgt, werden in eine kleine Extraktionshülse gegeben und im Exsiccator über P_2O_5 getrocknet. Die Resthirne werden in 4proz. Formalin aufbewahrt. Nach 24 Stunden wird das getrocknete Material im Mikrosoxhlet mit Kühlmantel nach Jatzkewitz und Pilz (19) 2 Stdn. mit Diäthyläther extrahiert.

a. Säulenchromatographische Auftrennung des Ätherextrakts

Die Auftrennung des Ätherextrakts in eine Fettsäure-, eine Ester- und eine Phosphatidfraktion erfolgt nach der Vorschrift von McCarthy und Duthie (20) durch Säulenchromatographie an basischem Kieselgel. 1 g speziell vorbereitetes Kieselgel (20) wird mit 2 ml Isopropanol-KOH und 6 ml Diäthyläther verrührt und in ein Glasrohr von 0,7 cm innerem Durchmesser gefüllt, das unten zu einer Spitze ausgezogen und mit etwas fettfreier Watte verschlossen ist. Der Ätherextrakt wird auf

die Säule gegeben. Mit etwa 15 ml Diäthyläther lassen sich Cholesterin, Cholesterinester und Glyceride, dann mit ungefähr 10 ml 2-proz. Ameisensäure in Äther die freien Fettsäuren eluieren. In Vorversuchen wird gezeigt, daß dabei auch sehr langkettige, wenig dissoziierte Fettsäuren nur in Spuren in die Esterfraktion geraten. Die Phosphatide bleiben als gelbliche Zone am oberen Säulende.

b. Untersuchung der Fettsäuren

Die Analyse der freien sowie der durch Hydrolyse aus den Triglyceriden gewonnenen Fettsäuren wird in der bereits beschriebenen (S. 16 u. 17) Modifikation des Kaufmannschen Verfahrens (10) ausgeführt. In Vorversuchen wird die Aktivitätsverteilung in Chromatogrammen der reinen tritiummarkierten Lignocerinsäure mit und ohne Zusatz einer ca. fünffachen Menge an inaktiver Stearinsäure ermittelt. Der Anteil des Stearinsäurebereichs an der Gesamtaktivität beträgt in beiden Fällen 0,30%. Daraus geht hervor, daß bei der angewandten dünnschichtchromatographischen Methode Fettsäuren verschiedener Kettenlänge nicht durch Mitschleppeffekte miteinander verunreinigt sind.

c. Untersuchung der Esterfraktion

Ein Teil der Esterfraktion wird punktförmig in einer Ecke einer normalen, halbstündig bei 105° aktivierten Kieselgelplatte aufgetragen und mit Äthylendichlorid chromatographiert (16). Man läßt das Fließmittel 18 cm hochsteigen. Cholesterinester wandern mit der Front, Mono- und Diglyceride bleiben in Startnähe, während Triglyceride dazwischen liegen. Man trennt nun die Kieselgel-Substanzstrecke von dem Rest der noch unbenutzten Kieselgelschicht, indem man einen 2 mm breiten Streifen Kieselgel mit dem Spatel entfernt. Die Platte wird nun um 90° gedreht und so in eine etwa 50 ml halbkonzentrierte Salzsäure enthaltende Chromatographiekammer gestellt, daß nur die Substanzstrecke der unauflösbaren Einwirkung der Salzsäure ausgesetzt ist. Unterläßt man die Teilung der Kieselgelschicht, dann ergeben sich bei der folgenden Dünnschichtchromatographie der hydrolytisch freigesetzten Fettsäuren erhebliche Verschiebungen der R_F-Werte. Man läßt die Säure 12 Stdn. lang bei 120° auf die Platte einwirken. Nach wird die Platte aus der Kammer genommen und zur Entfernung der Salzsäure über eine Stunde bei 120° im Trockenschrank gelassen. Nach dem Abkühlen wird die Trockenzone mit einem Kieselgel-Undecanägentisch aus der Tube beschichtet und glattgestrichen. Schließlich hydrophobiert man die Platte, indem man sie mit dem Frontende nach unten in Undecan-Peroläther (20:80 Vol. Teile) stellt und das Imprägnierungsmittel hochsteigen läßt. Nun werden die Fettsäuren in bestimmter Weise aufgetrennt. Die Cholesterinester werden nicht hydrolytisch gespalten, sondern vorher mit Tetrachlorkohlenstoff als Mischmittel zur Dünnschichtchromatographie charakterisiert (16).

4. RADIOCHEMISCHE MESSMETHODEN

a. Messung mit dem Radiopapierchromatographen

Auf der von Fließmittel und Undecan befreiten Kieselgelschicht werden die Fettsäuren mit einer wässrig-alkalischen Lösung von Bromthymolblau (10-fach sichtbar gemacht; dann läßt man die Schicht gut trocknen und besprüht sie mit Neotan (Merck). Wenn man nach 24 Std. die Dünnschichtplatte kurz in lauwarmes Wasser taucht, kann man die neatanfixierte Sorbenschicht glatt und quantitativ vom Glasträger ablosen. Die am Rand zum Abziehen aufgeklebten Tesafilmstreifen werden rasch entfernt, damit die Kieselgelschicht beim Trocknen plan bleibt. Nun wird ein etwa 4 cm breiter Streifen, der das auf Radioaktivität zu prüfende Fettsäuregemisch enthält, mit der Schere aus der Kieselgelschicht geschnitten und so auf einen Hostaphanband des Radiopapierchromatographen FH 452 der Firma Frieseke und Höpfner befestigt, daß die glatte, ursprünglich der Glasfläche zugekehrte Seite unmittelbar der Spezialblende des Methandurchflußzählers FH 407 (der selben Firma) zugewandt ist. Die Schrittlänge beträgt im allgemeinen 0,5 mm, die Impulsvorwahl 1000.

b. Messung im Flüssigkeits-Szintillationszähler

Als Meßgerät dient der Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 314 EX. Die Zählflüssigkeit besteht aus Toluol, das pro Liter 5 g 2,5-Diphenyloxazol (=PPO), 0,3 g 1,4-bis-(2,4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (=Dimethyl-POPOP) und 40 g Thixotropic Gel Powder enthält (23). Die zu messenden Proben werden durch Abpipettieren aus Lösungen oder durch fraktioniertes Auskratzen von der Dünnschichtplatte oder durch Zerschneiden von Neatanchromatogrammen in einzelne Segmente gewonnen. Die Probengläser werden bis zu konstanter Aktivität im gekühlten Probensammler des Instruments gelassen. Jede Probe wird 10 Min gezählt. Wegen des Löscheffekts wird eine Anfärbung mit Bromthymolblau vermieden.

ERGEBNISSE

Männliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von etwa 2 1/2 Monaten erhielten in einen durch Hitzekoagulation hervorgerufenen cerebralen Nekroseherd radioaktive Natriumlignoceratsuspension injiziert und wurden in Gruppen zu je vier 2, 4, 8, 12, 16 und 32 Tage nach dem Eingriff getötet. Die Gesamtaktivität im Ätherlöslichen, in der Neutralfettfraktion und in der Fraktion der freien Fettsäuren der geringsten Markzerfallsherde wurde jeweils bestimmt (Tab. 1). Die bei der Aufreinigung der Ätherextrakte auf der Säule verbleibenden Phosphatide wurden nicht

untersucht. Um festzustellen, in welchem Ausmaß etwa die ätherunlöslichen Coenzym A-Derivate (als metabolisch aktive Form der Fettsäuren) vorlagen, wurde der Extraktionsrückstand eines Nekroseherdpools (8. Tag) mit Natronlauge behandelt, um das Coenzym A abzuspalten; die Fettsäuren wurden nach Ansäuern mit Petroläther ausgeschüttelt. Die Aktivität betrug 25000 Imp./Min (knapp 3% der Aktivität im Ätherlöslichen). Eine qualitative Analyse ergab Lignocerinsäure mit geringen Beimengungen niedriger Homologe. Ob es sich hierbei tatsächlich um die aktivierten oder einfach nur um freie Fettsäuren handelte, die ans Papier der Extraktionsnulse adsorbiert geblieben waren, konnte nicht entschieden werden.

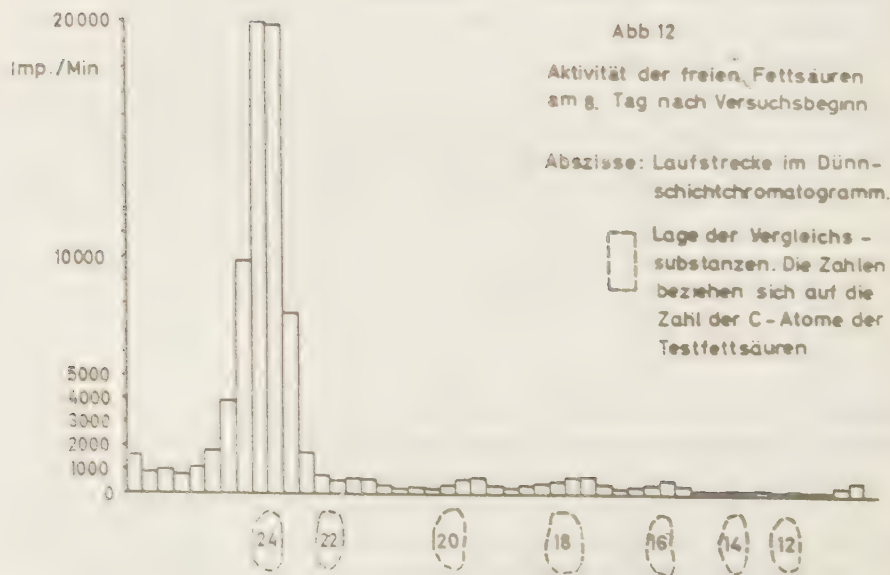
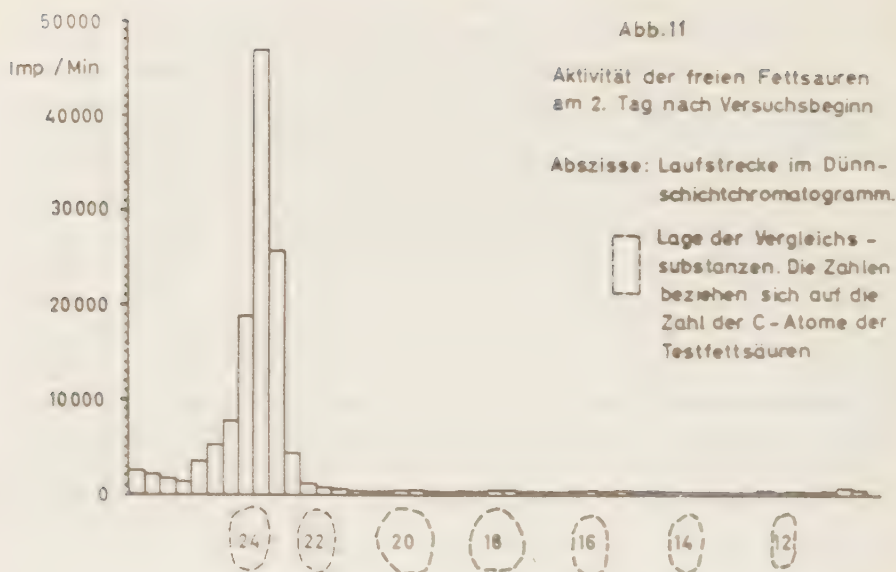
TAB. 1

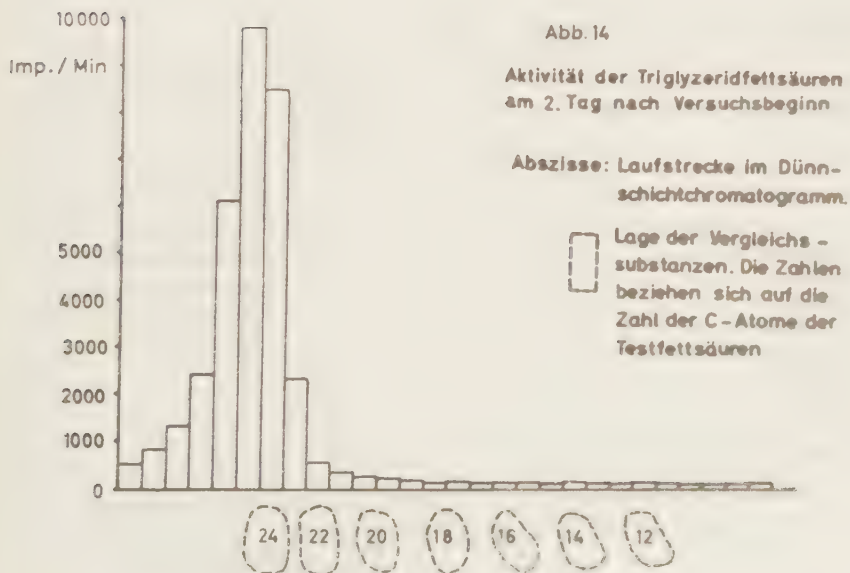
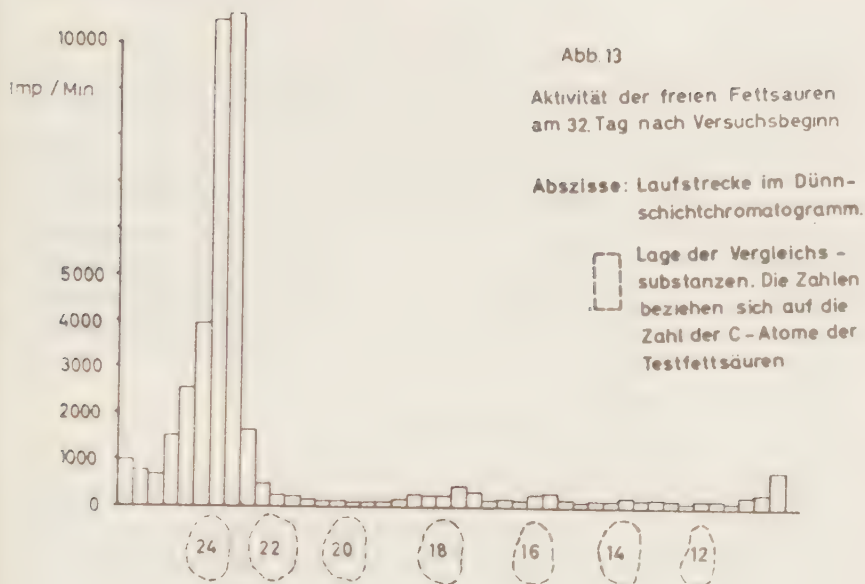
Überlebenszeit (Tage)	Aktivitäten in 1000 Imp./Min		
	Ätherextrakt	Ester	Freie Fettsäuren
2	2000	280	1200
4	760	240	345
8	820	190	450
12	230	100	50
16	150	60	45
32	160	60	70

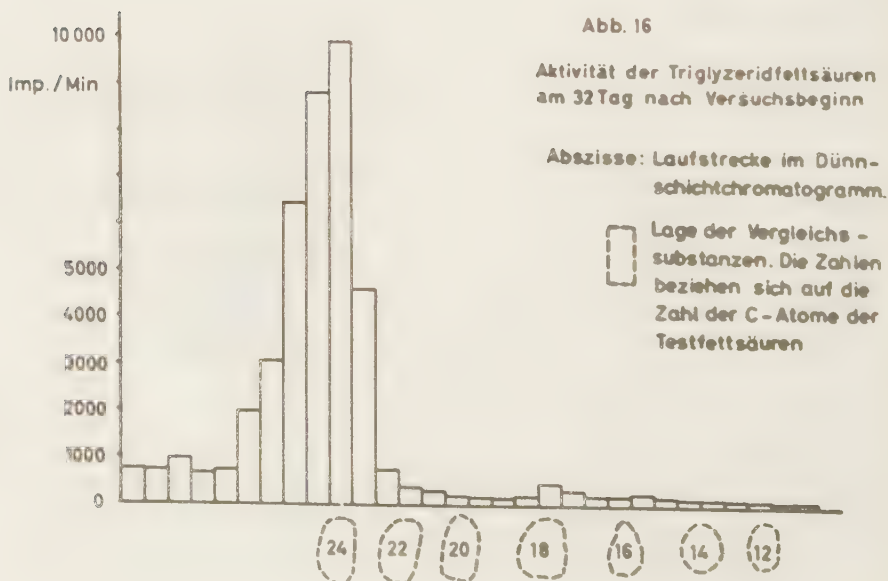
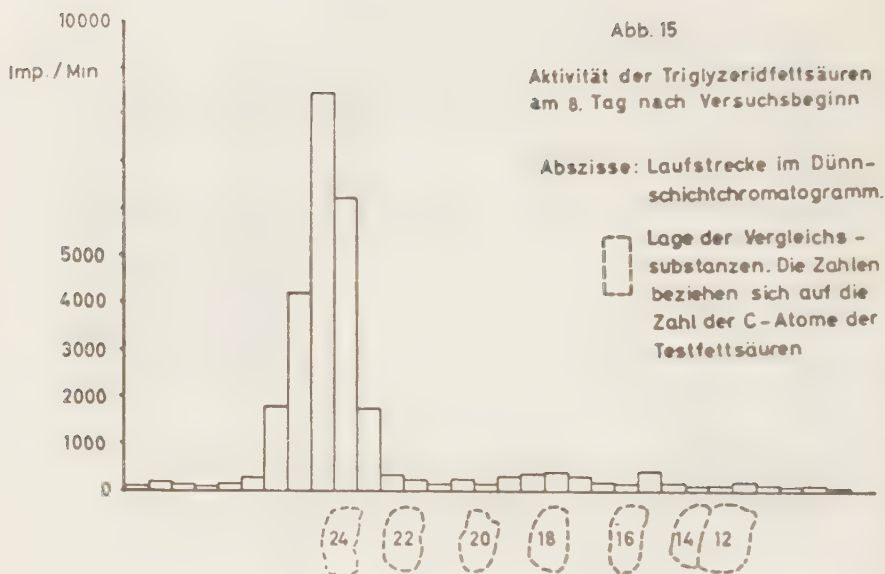
Die niedrigeren Werte des 12. und 16. Tages rühren davon her, daß die Tiere hierbei nur 8 statt 10 μ l der Suspension injiziert erhalten hatten.

Die Fraktion der freien Fettsäuren wurde jeweils dünnstichtchromatographisch aufgetrennt und im Flüssigkeits-Scintillationszähler auf Aktivität geprüft. Sie enthält in allen Abbauphasen überwiegend die radioaktive Lignocerinsäure. Am 4. Tag sind unklar, am 8. Tag deutlich kleine Aktivitätsgipfel im Bereich der Behen-, Arachin-, Stearin- und Palmitinsäure zu sehen; nach einem Monat sind dann - von der Startsubstanz abgesehen - Aktivitäten nur noch im C_{16} - und C_{18} -Bereich erkennbar (Abb. 11-13). Bei der Fettsäureanalyse in der Fließmittelfront auftretende Aktivitäten können davon herrühren, daß bei der Elution der Fettsäuren an der McCarthy-Säule Spuren aktiver Phosphatide mitgespült worden sind.

Die dünnstichtchromatographische Untersuchung der Esterfraktion mit Äthylendichlorid und Tetrachlorkohlenstoff ergab, daß die Radioaktivität vorwiegend in den Triglyceriden zu finden ist. Bei der Aufreinigung der Ester mit Äthylendichlorid enthielten die Cholesterinester schon nach zwei Tagen etwa ein Drittel der Gesamtaktivität der Esterfraktion, während sie nach den Ergebnissen der Tetrachlorkohlenstoff-Chromatographie daran in den ersten Tagen nur mit 5-10% und erst







von der dritten Woche an mit etwa der Hälfte beteiligt waren. Die Ursache für die Diskrepanz blieb unklar.

Die durch Verseifung der Triglyceride gewonnenen Fettsäuren wiesen - mit Ausnahme der polaren Verunreinigungen - dieselbe Aktivitätsverteilung auf wie die freien Fettsäuren: Zwei Tage nach der Injektion reine Lignocerinsäure, später dazu geringe Mengen Abbauprodukte von C_{22} bis C_{16} , schließlich neben Lignocerinsäure nur noch kleine Peaks im Bereich der Stearin- und Palmitinsäure (Abb. 14-16). Die Cholesterinester, die sich auf der Dünnschichtplatte nicht verseifen ließen, wurden nach der Kettenlänge ihrer Fettsäuren in Tetrachlorkohlenstoff aufgetrennt. Das Ergebnis war unbefriedigend: Die Aktivitätsmessungen ergaben Gipfel für das Lignocerat mit einer "Schulter" im Stearatbereich. Ein genaues Mengenverhältnis konnte nicht abgelesen werden.

DISKUSSION

Die Deutung der erhobenen Befunde ist nicht einfach. Eine grundsätzliche Schwierigkeit ergibt sich daraus, daß über den zeitlichen Ablauf, den Umfang und die Geschwindigkeit der verschiedenen chemischen Prozesse beim Markscheidenzerfall wenig bekannt ist. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Sphingolipiden und Glycerin-phosphatiden, die Aktivierungs-, Oxydations- und Veresterungsraten der freigesetzten Fettsäuren, die Schnelligkeit der Triglycerid- und Cholesterinesterbildung und -spaltung lassen sich allenfalls schätzen; wie weit Fettsäuren abgebaut oder intakt aus dem Markzerfallsbereich abtransportiert werden, entzieht sich bisher genauer Kenntnis. Es läßt sich daher bei der Diskussion der Ergebnisse manchmal nicht vermeiden, den Stoffwechsel von intaktem Gehirn oder von Makrophagen in anderen Organen zum Vergleiche heranzuziehen.

Dazu kommt, daß die Versuchsanordnung selbst nur beschränkte Aussagen zulaßt. So konnte etwa die Menge des durch die Oxydation von markiertem Material anfallenden schweren Wassers nicht ermittelt werden. Bei der einfachen Bestimmung der Gesamtaktivitäten ergaben sich starke Schwankungen, die von individuellen Abweichungen herrühren: Die Ausdehnung des Nekroseherdes, der Modus der Applikation, vor allem das Ausmaß der Blutungen und damit des mechanischen Abtransports der injizierten Suspension sind Größen, die naturgemäß nicht konstant zu halten sind. Um die Streubreite der Meßergebnisse einengen zu können, hätte man in größeren Serien arbeiten müssen; wegen der zeitraubenden Reinigung der radioaktiven Lignocerinsäure stand jedoch nur wenig Material zur Verfügung.

Trotz der dargelegten Schwierigkeiten kann aufgrund des durchgeführten Versuches folgendes als gesichert gelten:

1. BEIM MARKZERFALL FINDET EIN ABBAU DER LIGNOCERINSÄURE STATT

Die im Verlauf eines Monats zu beobachtende Abnahme der Gesamtaktivität sowie das Auftreten deutlicher, wenn auch geringer Aktivitäten im Bereich der Behen-, Arachin-, Stearin- und Palmitinsäure lassen allerdings auch andere Erklärungen zu, deren Stichhaltigkeit im folgenden kurz geprüft werden soll.

Es kann sich zunächst ganz einfach um einen mechanischen Substanzverlust handeln. Für die beträchtliche Aktivitätsabnahme bis zum Ende des zweiten Versuchstages - zu diesem Zeitpunkt waren nur noch 4% der applizierten Gesamtaktivität vorhanden - kann tatsächlich kein chemischer Abbauprozess verantwortlich gemacht werden. Vielmehr ist dieser Verlust dem Umstand zuzuschreiben, daß bei den Injektionen ein großer Teil der Lignoceratsuspension aus dem Defekt wieder austrat; Blutungen und im postoperativen Verlauf vielleicht die Lymphzirkulation wirkten in gleicher Richtung. Der bereits am zweiten Tag zu beobachtende sehr starke Einbau in die Esterfraktion spricht für eine weitgehende intrazelluläre Fixierung der applizierten Lignocerinsäure. Die Abnahme der Aktivität kann von da an nicht mehr einfach als mechanisch bedingter Lignoceratschwund gedeutet werden. (Vorläufige autoradiographische Ergebnisse bestätigen diese Schlußfolgerung.)

Es bleibt allerdings die Möglichkeit, daß die Sphingolipide zwar von den Abraumzellen phagozytiert werden, dann aber keiner chemischen Umwandlung mehr unterliegen und intakt in die Blutbahn transportiert werden. Nun spricht aber das Auftreten aktiver kürzerkettiger Fettsäuren dafür, daß ein Abbau möglich ist. Zu den Bedenken, die Jatzkewitz und Mehl (2) aufgrund histologischer Befunde gegen die Ausschleusung der Sphingolipide oder ihrer unveränderten Fettsäuren vorbringen, tritt also die Überlegung, daß die Möglichkeit des Abbaus den Abtransport zwar nicht ausschließt, aber doch weniger wahrscheinlich macht.

An den Stellen des Moleküls, die physiologischerweise Doppelbindungen enthalten können, muß mit der Möglichkeit der spezifischen Dehydrierung (der entsprechenden gesättigten Verbindung) gerechnet werden (21); neuere Untersuchungen zeigen, daß in höheren Tieren die Biosynthese von Mono- und Polyensäuren auf diesem Weg erfolgen kann (22, 23, 24, 25). Demnach könnte man, da die bei dieser Untersuchung verwendete Lignocerinsäure durch Tritierung aus natürlich vorkommender Nervonsäure erhalten wurde, nun auch umgekehrt die beobachtete Abnahme der Gesamtaktivität und die radioaktiven Abbauprodukte auffassen als das Resultat einer spezifischen Detritierung der Lignocerinsäure zu Nervonsäure, wobei der größte Teil des Tritiums zu H^3HO verbrannt, ein kleinerer in Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge eingebaut wird. Daß diesem Mechanismus unter den Bedingungen des Markzerfalls eine Bedeutung zukommt, ist sehr unwahrscheinlich:

Jatzkewitz und Mehl (2) haben gefunden, daß nach längerer Prozeßdauer außer der Lignocerinsäure auch die Nervonsäure fehlt; zudem wird offensichtlich auch physiologischerweise die Nervonsäure nicht aus der Lignocerinsäure gebildet (26).

Da bekanntlich zur Einführung einer Doppelbindung in gesättigte aliphatische Ketten in der Regel Flavoproteine erforderlich sind, wäre anzunehmen, daß das freigesetzte Tritium quantitativ zu H^3HO verbrannt wird, das wieder in Fettsäuren eingebaut werden könnte. Jedoch ist von dieser Seite keine Verfälschung der Meßergebnisse zu erwarten: 24 Stdn. nach intracerebraler Injektion von H^3HO fand Gatt (18) im Gesamtlipoidextrakt nur 0,005% der verabreichten Aktivität wieder; Bloom, der sich für den Einbau von H^3HO in die Fettsäuren von Leber und Niere interessierte, ermittelte vergleichbare, eher noch niedrigere Einbauraten (27). Diese Mengen entsprachen bei einer intrazellulären, der Dehydrierung zugänglichen Lignocerinsäuremenge von etwa 2,5 Millionen Imp./Min nur etwa hundert Imp./Min - unter der Voraussetzung, daß die Abraumzellen eines Nekroseherdes die Syntheseleistung von intaktem Gehirn aufweisen. Das gebildete schwere Wasser bleibt also ohne meßbaren Einfluß.

Wenn mechanischer Abtransport, selektive Ausschleusung und spezifische Detritierung als Ursachen der Aktivitätsverminderung zwischen dem 2. und 32. Tag entfallen, bleibt als weitere Möglichkeit nur der Abbau der Lignocerinsäure.

Mit dieser Feststellung sind jedoch noch nicht alle Einzelfragen gelöst. Woher stammen die Aktivitäten in den Fettsäuren von C_{16} bis C_{22} ? Eine Neusynthese aus aktiven Azetatresten ist durchaus denkbar, zumal neuere histochemische Untersuchungen an Makrophagen in Nekroseherden ergeben haben, daß diese Zellen wahrscheinlich in sehr großem Umfang Fettsäuren synthetisieren (28, 29). Für diese Erklärung ließe sich außerdem anführen, daß aktive Fettsäuren mit kürzerer Kette als Palmitinsäure nicht eindeutig nachzuweisen sind. - Dagegen spricht die Tatsache, daß die Radioaktivität in den Abbaustufen etwa gleichmäßig auf Palmitin-, Stearin-, Arachin- und Behensäure verteilt ist; Bernhard und Pedersen (30) fanden nämlich nach Applikation von Azetat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ ins Rattenhirn, daß unter den aktiven Fettsäuren die Palmitinsäure dominierte, gefolgt von Stearin- und Ölsäure; an längerkettigen aktiven Fettsäuren erhielten die Untersucher nur Arachidonsäure in verschwindendem Ausmaß. Aufschlußreich sind in diesem Zusammenhang auch in vitro-Untersuchungen über die Fettsäuresynthese in Makrophagen vom Kanincheneritoneum (31), da diese Zellen den Fettkörnchenzellen im Gehirn in ihrer Stoffwechselleistung nahestehen dürften. Außer Myristinsäure wurden nur gesättigte und ungesättigte C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren gebildet.

Bei der β -Oxydation wird der Wasserstoff zum Teil auch auf Nicotinamid- α -dinucleoid (NAD) übertragen und kann durch die Transhydrogenation zur Fettsäuresynthese verfügbar gemacht werden, wie Bloom (27) gezeigt hat. Mit der

Inkubation von Leberhomogenaten: bis zu 1% des eingesetzten NAD-Wasserstoffs in den Fettsäuren wiederfand. Es kann also ein Einbau des Tritiums in die Fettsäuren auf diesem Weg erfolgen, selbst wenn das gebildete radioaktive Azetat vollständig verbrannt wird. Daß die Radioaktivität nicht auf Palmitin- und Stearinsäure beschränkt bleibt, ließe sich mit der direkten Hydrierung von ungesättigten C_{20} - und C_{22} -Fettsäuren erklären. Dagegen läßt sich einwenden, daß ungesättigte Säuren in vivo nicht oder nur in Spuren hydriert werden (32, 33, 34).

Die aktive Behen- und Arachinsäure sind somit aller Wahrscheinlichkeit nach unmittelbar durch Abbau aus der Lignocerinsäure entstanden, während für die aktive Stearin- und Palmitinsäure darüberhinaus eine Neusynthese aus Azetat-2- 3H nicht ausgeschlossen werden kann.

2. DER ABBAU ERFOLGT ÜBER DIE β -OXYDATION

Die neben dem Lignocerinsäuregipfel festgestellten geringen Aktivitäten entsprechen den R_F -Werten der niedrigeren, geradzahligen Fettsäuren. Die C_{24} -Fettsäuren können demnach unter den Bedingungen des Markzerfalls sofort vom β -Oxydationssystem angegriffen werden und werden nicht, wie Mead und Levis an intaktem Hirngewebe feststellten (35), durch α -Oxydation erst zu geringerer Kettenlänge abgebaut. Cerebronsäure als Intermediärprodukt der α -Oxydation konnte in dem durchgeführten Versuch nicht beobachtet werden, während im intakten Gehirn applizierte Lignocerinsäure in großem Umfang in Cerebronsäure umgewandelt wird (36).

3. DER ABBAU DER LIGNOCERINSÄURE FÜHRT ÜBER DIE STUFE DER STEARIN- UND PALMITINSÄURE HINAUS

Das C_{24} -Fettsäuredefizit beim Myelinabbau und die starke relative Zunahme von Stearin- und Palmitinsäure in Erweichungsherden - eine absolute Zunahme ist nicht festgestellt worden - konnten so gedeutet werden, daß der Abbau der Sphingolipoidfettsäuren auf C_{18} - und C_{16} -Ebene abgebrochen wird. Im Zuge dieser Untersuchung wurde jedoch in der freien und veresterten Stearin- und Palmitinsäure nur etwa 1% derjenigen Aktivität wiedergefunden, um welche die Lignocerinsäure abgenommen hatte.

4. DIE AKTIVITÄT WIRD IN GROSSEM UMFANG IN DIE TRIGLYCERIDE EINGEBAUT

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, weisen die Fraktionen der freien Fettsäuren und der Ester vom 2. Tag an größenordnungsmäßig gleiche Aktivitäten auf. Die Tatsache, daß C_{24} -Fettsäuren im Organismus nur in Säureamidbindung gefunden werden, hat zu der Annahme geführt, daß es sich bei Lignocerinsäureestern, deren Entstehung man nach Verabreichung aktiver Lignocerinsäure in Leber und Gehirn beobachten konnte, um Artefakte handle, die dadurch zustandekämen, daß die C_{24} -Fettsäuren in unphysiologischer Dosis angeboten werden (18). Inzwischen ist bei Untersuchungen, in denen N-Lignoceryl-1- ^{14}C -psychosin Ratten intrakraniell gespritzt wurde, der Einbau der Lignocerinsäure in Ester nachgewiesen worden (37). Damit ist erwiesen, daß auch physiologischerweise die C_{24} -Fettsäuren, wenn auch in kleinster Menge, in Estern vorkommen können. Die in dem diskutierten Versuch beobachteten Lignocerinsäureester können also nicht von vornherein als Kunstprodukte abgetrennt werden, ganz abgesehen davon, daß man bei Makrophagen mit Stoffwechselleistungen rechnen muß, die sich von denen des Normalhirns unterscheiden. Beträchtliche Triglyceridbildung ist in Makrophagen beobachtet worden (38, 39).

5. EIN TEIL DER AKTIVITÄT WIRD IN DIE CHOLESTERINESTER EINGEBAUT

Der Anteil der Cholesterinesteraktivität an der Gesamtaktivität nimmt mit fortschreitendem Markabbau zu. Die Bildung von Cholesterinestern in Makrophagen ist ebenfalls beschrieben worden (40).

Der durchgeführte Versuch läßt mehrere Erklärungen des C_{24} -Fettsäuredefizits zu. Einmal konnte der bevorzugte Abbau der säureamidartig gebundenen Fettsäuren darauf beruhen, daß sie infolge rascherer Hydrolyse ihrer Stammsubstanzen schneller freigesetzt und abgebrannt werden. Dagegen spricht, daß in Markzellen die Phosphatide doppelt so schnell wie die Glykolipoide abnehmen. Eben- sowenig kann man die Thiokinasen für die unterschiedliche Abbaugeschwindigkeit verantwortlich machen: Fettsäuren mit mehr als 18 C-Atomen werden eher langsam aktiviert (18, 41). Postuliert man schließlich ein spezifisch auf sehr langkettige Fettsäuren (> 18 C-Atome) eingestelltes Enzym der β -Oxydation, dann wäre eine Anhäufung von markierten Produkten in der Stearin- und Palmitinsäurefraktion zu erwarten, die in dem durchgeführten Versuch gerade nicht beobachtet werden konnte.

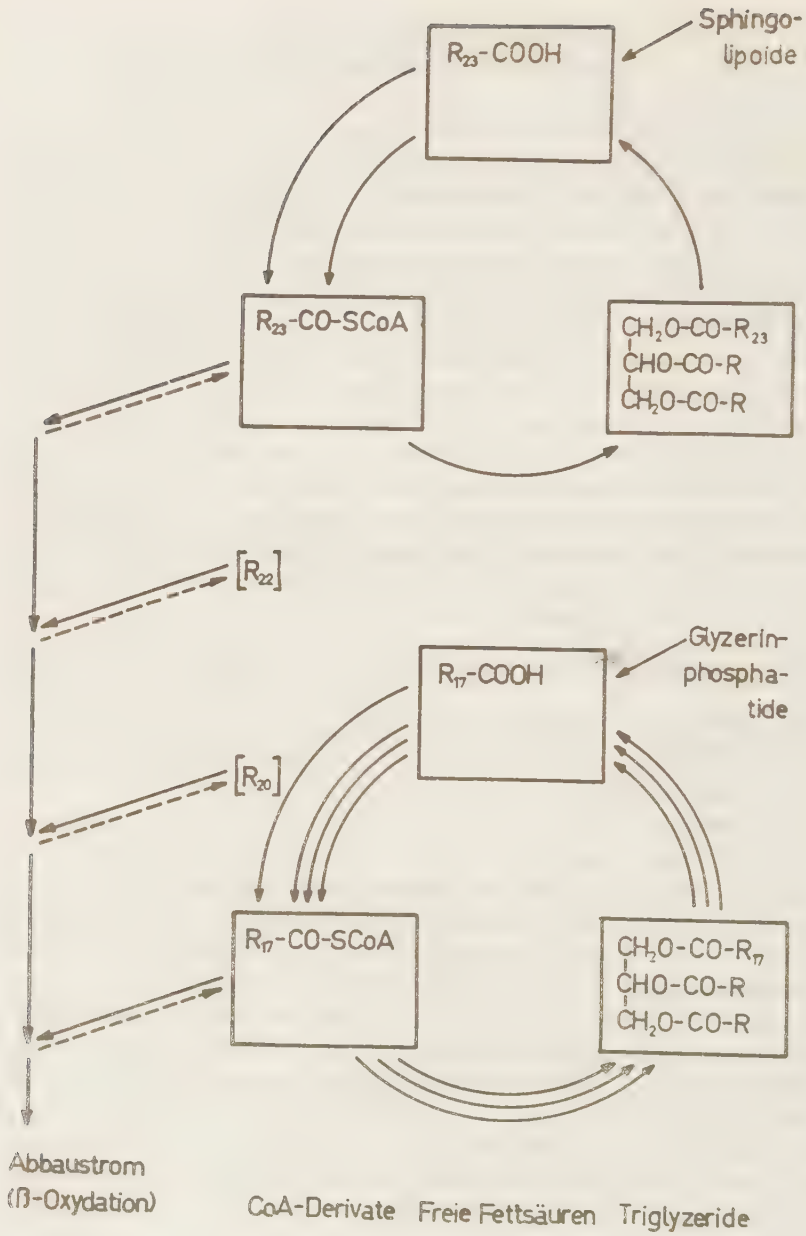


Abb.17 Abbauschema

In dem skizzierten Abbauschema (Abb. 17) finden die Beobachtungen von Jatzkewitz und Mehl (2) sowie die eigenen Befunde eine einfache Deutung. Sie stützt sich auf die bekannte Tatsache, daß in Triglyceride bevorzugt C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren eingebaut sind (41). Beim Myelinabbau werden die Fettsäuren aus ihren Stammsubstanzen, den Sphingolipoiden (überwiegend C_{24}) und den Glycerin-phosphatiden (C_{16} , C_{18}) freigesetzt und in die CoA-Derivate übergeführt. (Die esterartig gebundenen Fettsäuren unterliegen möglicherweise daneben auch Umesterungsprozessen). Die aktivierten Säuren können nun als Triglyceride erscheinen oder durch β -Oxydation verbrannt werden. Die geringe Substratspezifität der beteiligten Enzyme macht es wahrscheinlich, daß der durch die β -Oxydation bedingte Abstrom aus den Pools der CoA-Derivate verschiedener Kettenlänge etwa gleichmäßig erfolgt. Die Fettsäuren werden zum weitaus überwiegenden Teil "durchgebrannt" und gelangen nur zu einem verschwindenden Bruchteil (gestrichelte Pfeile in Abb. 17) in die CoA-Derivat-Pools der nächstniedrigen (= um 2 C-Atome kürzeren) Homologen, von wo aus sie zusammen mit hydrolytisch (aus Stammsubstanzen und neugebildeten Estern) freigesetzten und dann aktivierten Fettsäuren gleicher Kettenlänge oxydiert oder verestert werden. Die "Stabilität" einer Fettsäure im Verlauf des Markzerfalls hängt davon ab, in welchem Umfang sie in die Triglyceridfraktion eingebaut wird. C_{16} - und C_{18} -Fettsäure-CoA werden zu einem vergleichsweise kleinen Teil der β -Oxydation zugeführt; überwiegend werden sie verestert und später als inaktive Fettsäuren wieder freigesetzt, die nun erneut aktiviert werden, um zum größten Teil wieder in die Triglyceridfraktion einzugehen. Die Fettsäurezusammensetzung der Glycerinester, damit im weiteren Verlauf auch der Fraktionen der freien Fettsäuren und Cholesterinester, wird immer mehr zugunsten der Stearin- und Palmitinsäure verschoben, bis der Anteil der C_{24} -Fettsäuren die Nachweisgrenze erreicht oder unterschreitet. Möglicherweise wird die Verschiebung der Mengenverhältnisse unter den Fettsäuren verschiedener Kettenlänge durch Neusynthese von C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren in den Makrophagen beschleunigt.

Daß auch die Cholesterinester nach längerer Prozeßdauer die C_{24} -Fettsäuren nur in geringen Mengen enthalten (2), kann davon herrühren, daß sie in größerem Umfang erst zu einer Zeit entstehen, wo langkettige Fettsäuren kaum mehr verfügbar sind.

Für die dargelegte Hypothese sprechen einige Einzelbeobachtungen: Die Aktivität der Esterfraktion nimmt etwa im gleichen Maß ab wie die der freien Fettsäuren, d.h. die Triglyceride, die in den ersten beiden Wochen den Hauptanteil der Esterfraktion ausmachen, stellen keine Endstation dar, sondern stehen mit den Pools der freien Fettsäuren in ständigem Austausch. Die weitgehende Identität der Aktivitätsverteilung stützt diese Annahme. Daß sich die oxydativen Abbaustufen der Lignocerinsäure nur bis zur Palmitinsäure eindeutig verfolgen lassen,

erklärt sich daraus, daß Fettsäuren mit weniger als 16 C-Atomen nur in sehr geringem Ausmaß in die Triglyceride eingebaut werden (41) und dann ebensowenig in den freien Fettsäuren erscheinen. Die geringen Aktivitäten in den Abbaustufen der Lignocerinsäure lassen darauf schließen, daß der Abbau überwiegend an den Pools der freien und gebundenen niedrigeren Fettsäuren vorbeiführt. Würden die Pools nicht umflossen, sondern durchströmt werden, dann müßte die Verdünnung des radioaktiven Materials durch inaktive endogene Fettsäuren zu einer Verzögerung des Abbaus der radioaktiven Fettsäuren und zu einer Anhäufung markierter C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren führen. Daß die C_{22} - und C_{20} -Fettsäurepeaks im Lauf der dritten Woche verschwinden, liegt anscheinend an der nur mäßigen Verdünnung der entsprechenden Pools durch endogenes Material. Die Radioaktivität wird dadurch ziemlich rasch wieder ausgewaschen, zumal die spezifische Aktivität der durch β -Oxydation nachgelieferten Fettsäuren ständig abnimmt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die chemischen Veränderungen der Markscheidenlipide, die beim Zerfall nervaler Strukturen aufgrund mechanisch-thermischer Schädigung oder Gefäßverschluß beobachtet werden, beschränken sich nicht auf die bereits bekannten hydrolytischen Prozesse und Veresterungen der dabei freigesetzten Fettsäuren mit Glycerin und Cholesterin, sondern schließen weitergehende Umwandlungen ein.

Mit Hilfe der Isotopenmarkierungstechnik und dünnschichtchromatographischer Methoden wurde das Schicksal einer spezifischen Sphingolipoidfettsäure, nämlich tritierter Lignocerinsäure (n -Tetracosansäure) hoher spezifischer Aktivität beim Markzerfall untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß die Lignocerinsäure einem Abbau unterliegt, der β -oxydativ zu niedrigeren Fettsäuren führt. Das Überwiegen von C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren unter den Zerfallsprodukten läßt sich durch die Annahme eines Triglyceridzyklus in den abbauenden Fettkörnchenzellen erklären. Es konnte so ein einfaches Abbauschema skizziert werden, in das sich die in dieser Arbeit und früher erhobenen Befunde gut einordnen lassen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) R.J. ROSSITER in K.A.C. Elliott, I.H. Page und J.H. Quastel, Neurochemistry, S. 696, Thomas, Springfield (Ill.) 1955
- 2) H. JATZKEWITZ und E. MEHL Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem. 329, 264 (1962)
- 3) N.S. RADIN und Y. AKAHORI J. Lip. Res. 2, 335 (1961)
- 4) H. JATZKEWITZ Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem. 311, 279 (1958)
318, 265 (1960)
- 5) F. RENNKAMP Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem. 284, 215 (1949)
- 6) S. HÜNIG, E. LÜCKE und E. BENZING Chem. Berichte 91, 132 (1958)
- 7) E.P. JONES, L.H. MASON, H.J. DUTTON, R.F. NYSTROM J. Organ. Chem. 25, 1413 (1960)
- 8) K. KISHIMOTO und N.S. RADIN J. Lip. Res. 4, 437 (1963)
- 9) H.J. NIJKAMP Anal. Chim. Acta 10, 448 (1954)
- 10) H.P. KAUFMANN und Z. MAKUS Fette, Seifen, Anstrichm. 62, 1014 (1960)
- 11) H.A. COLMANT Habil. Univ. Hamburg
- 12) J. ESCOLA und H. HAGER Beitr. Path. Anat. allg. Path. 188, 25 (1963)
- 13) H. MEESSEN und O. STOCHDORPH in Handb. Spez. Path. Anat. u. Hist. XIII, 1B, 1384 (1957)
- 14) H.P. KAUFMANN und Z. MAKUS Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem. 317, 39 (1959)
- 15) E. MEHL und H. JATZKEWITZ Naturw. 50, 227 (1963)
- 16) H. JATZKEWITZ und E. MEHL Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem. 320, 251 (1960)

- 17) A. WACKER und
L. TRÄGER Angew. Chemie 72, 168 (1960)
- 18) S. GATT Biochim. Biophys. Acta
70, 370 (1963)
- 19) H. JATZKEWITZ Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem.
336, 25 (1964)
- 20) R.D. McCARTHY und
A.H. DUTHIE J. Lip. Res. 3, 117 (1963)
- 21) J.A. LOVERN The Chemistry of Lipids of Biochemical
Significance London, Methuen & Co Ltd
(1955)
- 22) J.F. MEAD Fed.Proc. 20, 952 (1961)
- 23) J.B. MARSH und
A.T. JAMES Biochim. Biophys. Acta
60, 320 (1962)
- 24) E. KLENK und
H. PFLÜGER Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem.
335, 53 (1963)
- 25) M. LAURYSENS und
Mitarb. J. Lip. Res. 2, 383 (1961)
- 26) A.J. FULCO und
J.F. MEAD J. Biol. Chem. 236, 2416 (1961)
- 27) B. BLOOM J. Biol. Chem. 234, 2158 (1959)
- 28) L.J. RUBINSTEIN und
B. SMITH Nature, 193, 895 (1962)
- 29) B. SMITH und
L.J. RUBINSTEIN J. Pathol. Bacteriol.
83, 572 (1962)
- 30) K. BERNHARD und
W. PEDERSEN Helv. Chim. Acta
16, VI, Nr. 206 (1963)
- 31) A.J. DAY, N.H. FIDGE
und G. WILKINSON Biochim. Biophys. Acta
84, 149 (1964)
- 32) J.F. MEAD und
J.C. NEVENZEL J. Lip. Res. 1, 305 (1960)
- 33) Y. STEIN und O. STEIN Biochim. Biophys. Acta
54, 555 (1961)

- 35) J.F. MEAD und
G.M. LEVIS Biochem. Biophys. Res. Comm.
9, 231 (1963)
- 36) A.K. HAJRA und
N.S. RADIN J. Lip. Res. 4, 448 (1963)
- 37) C. KRYSTYNA, KOPACZYK
und N.S. RADIN Fed. Proc. 23, 230 (1964)
- 38) A.J. DAY und N.H. FIDGE J. Lip. Res. 3, 333 (1962)
- 39) A.J. DAY und N.H. FIDGE J. Lip. Res. 5, 163 (1964)
- 40) A.J. DAY Quart. J. Exptl. Physiol.
45, 55 (1960)
- 41) A. KORNBERG und
W.E. PRICER JR. J. Biol. Chem. 204, 329 (1953)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor
Dr. H. Jatzkewitz für die Überlassung des Themas
sowie für Rat und Hilfe bei der Durchführung der
Arbeit herzlich danken.

LEBENS LAUF

Am 25.9.1937 wurde ich als zweites von sieben Kindern des praktischen Arztes Dr. Heinrich Schmidt und seiner Ehefrau Maria, geb. Vierling in Nürnberg geboren. Ich besuchte die Volksschule in Hütten/Opf. und Nürnberg (1943-47) und anschließend das Humanistische Gymnasium Metten/Donau, wo ich im Juli 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1956/57 begann ich an der Universität München das Studium der Naturwissenschaft und wurde am 1. April zur Ableistung des Grundwehrdienstes eingezogen. Nach meiner Entlassung aus der Bundeswehr wandte ich mich in München dem Medizinstudium zu und legte im April 1960 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach Semestern an der Universität Mainz und der Freien Universität Berlin kehrte ich nach München zurück, wo ich am 4.10.1963 die ärztliche Prüfung bestand.

Im Juli 1961 erhielt ich von Herrn Privatdozenten Dr. H. Jatzkewitz das Thema zu meiner Dissertation, deren experimenteller Teil im April 1964 nach Beendigung des Studiums abgeschlossen wurde.

